02-03

TOYOBO

PerfectHyb™

Hybridization Solution

取扱い説明書

Code No.: HYB-101

TOYOBO CO., LTD. Biochemical Operations Department
OSAKA JAPAN

注意事項

・輸送条件： 本品は、室温でお届けいたします。

・容量、保存方法は以下のようになっております。

Code No.	容量	保存方法
HYB-101	250ml	室温（直射日光を避け保存）
HYB-101S	25ml	室温（直射日光を避け保存）

・低温で保管した場合、液中に析出物が生じることがあります。その場合、37℃程度に加温し、溶解してからご使用ください。

・本試薬はすべて研究用試薬です。診断・臨床用試薬として使用しないでください。本キットの使用にあたっては、実験室での一般の注意事項を厳守し、安全に留意してください。

・本試薬はホルムアミドなどの有機溶媒を含有しておりません。

・RI標識プローブを用いるにあたっては、以下の点にご注意ください。

- 保護手袋および保護衣、保護めがね等を着用してください。
- RI実験は、指定された区域内のみで行ってください。
- RI実験により発生した廃棄物は、指定された方法により十分な注意のもとに廃棄してください。

目 次

はじめに
概要 ……(1)
準備するもの ……(3)

方法
DNA、RNAプローブを用いた解析 ……(4)
オリゴヌクレオチドプローブを用いた解析 ……(7)

Appendix
試薬調製方法……(9)
プローブのストリッピング ……(10)
RI標識DNAプローブの簡易精製法……(11)

トラブルシューティング……(12)

関連商品……(13)

はじめに

概　要

特徴　**PerfectHyb™ Hybridization Solution**はプレミックスタイプのハイブリダイゼーション用バッファーです。本製品には以下のような特徴があります。

・**Northern** および **Southern blot** 解析に対応します。

・ハイブリダイゼーション時間を短縮できます。

・**RI** および **Non-RI標識プローブ**による解析が可能です。

・**ハイブリダイゼーションおよびプローブの洗浄が同一温度**に設定されているため、ハイブリダイゼーションオーブンを用いた解析に最適です。

・**Salmon sperm DNAなどの添加が不要**です。

・溶液の**粘性が低く**ハンドリングが容易です。

主な用途　**・Northern blot 解析**

DNAプローブ、RNAプローブ、オリゴヌクレオチドプローブによる解析が可能です。プレブロットタイプのメンブレン*の解析には、バックグラウンド、リハイブリダイゼーションなどを考慮して、RI標識したcDNAプローブもしくはオリゴヌクレオチドプローブを用いた解析をお奨めします。
Non-RI標識プローブはハイブリダイゼーション、検出条件により多少バックグラウンドが生じる場合がありますので、取扱説明書をよく読んでから実験を行ってください。

*いくつかのメーカーのプレブロットメンブレンで良好な結果が得られることを確認しています。

・Southern blot 解析

DNAプローブ、オリゴヌクレオチドプローブを用いた解析をお奨めします。Non-RI標識プローブはハイブリダイゼーション、検出条件により多少バックグラウンドが生じる場合がありますので、取扱説明書をよく読んでから実験を行ってください。

ハイブリダイゼーション促進効果

本試薬はハイブリダイゼーション促進剤を含有しており、ハイブリダイゼーション時間を短縮することができます。また、Northern blot解析において、従来法に比べシグナルの増強効果も認められます。

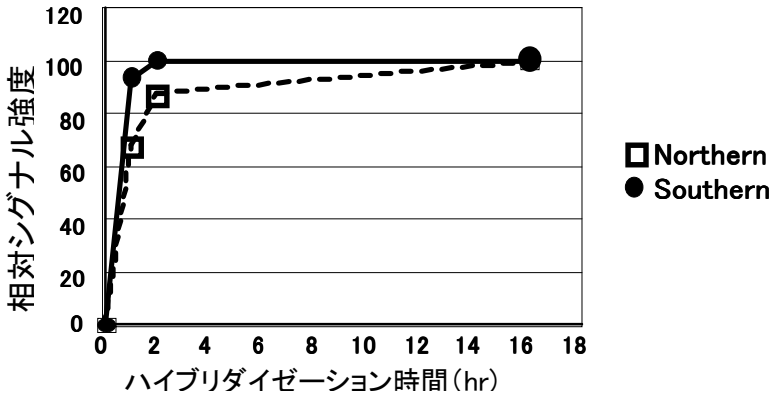

図1　Non-RI標識DNAプローブを用いた場合の、Northern blot(βactin cDNA Probe)、Southern blot(VNTR Probe)のハイブリダイゼーション時間と相対シグナル強度。
Total RNA 5μg、Genomic DNA 1μg使用。

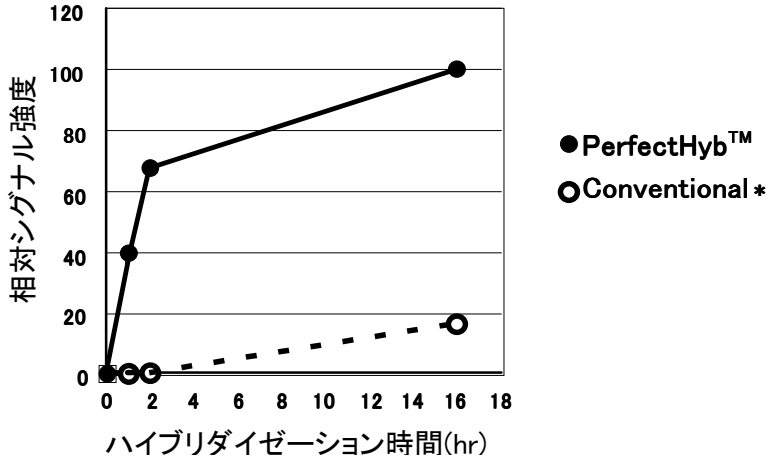

図2　RI標識プローブを用いた低発現遺伝子(Transferrin receptor mRNA)の検出。
ハイブリダイゼーション時間と相対シグナル強度。
Total RNA 5μg使用。
*Molecular cloning 7.52 (50%ホルムアミド)

準備するもの

はじめに　ハイブリダイゼーション実験をはじめるにあたり、以下のものが必要となります。

準備する試薬

・洗浄液A
2×SSC(pH 7.0)、0.1%SDS

・洗浄液B*
0.1×SSC(pH 7.0)、0.1%SDS

* Southern blot解析、RNAプローブを用いたNorthern blot解析時のみ必要となります。（→ P9を参考にして調製してください）

その他準備するもの

・恒温槽（できれば振とう機能つきのもの）もしくはハイブリダイゼーションオーブン

・ヒートシーラー（オーブン使用時は不要）

・ハイブリダイゼーションバッグ（オーブン使用時は不要）

・X線フィルム

方法

DNA, RNAプローブを用いた解析

はじめに　ここではDNAプローブおよびRNAプローブを用いた解析方法を紹介します。プローブ、ハイブリ条件などについて下の説明をよく読んだ後に、プロトコールに従って実験を行ってください。
なお、オリゴヌクレオチドプローブの場合は、p7をご覧ください。

プローブの調製

・プローブの調製は各標識キットの取扱い説明書に従って行い、標識後にフリーのヌクレオチドを除去してください。

・RI標識プローブは精製後に比活性を測定し、効率よく標識されていることを確認してください。非RI標識プローブの場合は、それぞれの標識キットの取扱い説明書に従いスポットテストを行って、ラベリング効率からプローブ濃度を算出してください。

・4kb以上の鋳型から調製した長いプローブや、繰り返し配列を有するプローブではバックグラウンドの上昇や、予期せぬエキストラバンドが生じる場合があります。プローブ設計には十分気を付けてください。

ハイブリ・洗浄条件

・ハイブリダイゼーション条件、洗浄条件は下記の通りです。以下のプロトコールではこの表に従ってください。

	Probe	Label	Hybri.	一次洗浄	二次洗浄
時間	-	-	1h～ ｵｰﾊﾞｰﾅｲﾄ	5分間 ×2回	15分間 ×2回
Northern	DNA	RI Non-RI	68℃	68℃(A)	68℃(A)
	RNA	Non-RI	68℃	68℃(A)	68℃(B)
Southern	DNA	RI Non-RI	68℃	68℃(A)	68℃(B)

(A):洗浄液 A 、(B):洗浄液 B

・恒温槽を用いる場合には、ハイブリダイゼーションにハイブリバッグを用いると便利です。洗浄はタッパー等を用い、できるだけ振とうしながら行ってください。

・RI標識プローブを用いる場合ハイブリダイゼーションオーブンを用いると、汚染が少なく便利です。ハイブリダイゼーションオーブンを用いる場合は、ハイブリダイゼーションボトル中でハイブリダイゼーションおよび洗浄を行ってください。

プローブ濃度

推奨するプローブ濃度は以下の通りです。プローブ濃度が高いほどハイブリダイゼーションは促進される傾向にありますが、特にNon-RI系においては、バックグラウンドも上昇することを考慮に入れて濃度を決定してください。

Label	Probe	Probe conc.
RI	DNA	1～2×10^6 cpm/ml or 1～10ng/ml
Non-RI	DNA	0.2～1ng/ml
	RNA	

ハイブリ時間

・ハイブリダイゼーションの時間は下記の表を参考にしてください。

	ターゲット遺伝子の発現量	ハイブリ時間
Southern	-	1時間
Northern	高	1時間
	中	2時間
	低	2時間～オーバーナイト
長鎖(4kb以上）のプローブを用いる場合		オーバーナイト* (Non-RI標識の場合、プローブ濃度を低めに設定する)

* バックグラウンドを生じ易い長鎖のプローブ(4kb以上）を用いる場合、オーバーナイトハイブリダイゼーションを行った方がバックグラウンドが低下し、高いS/N比が得られることがあります。また、非RI標識プローブを用いる場合は、プローブ濃度を低めに設定してください。

・ハイブリダイゼーション速度はプローブ濃度が高いほど促進される傾向にありますが、バックグラウンドも上昇します。目的遺伝子の発現量、プローブ濃度からハイブリダイゼーションの時間を決定してください。

・発現量が未知の遺伝子、レア遺伝子の検出にはRI標識プローブを用いたオーバーナイトでのハイブリダイゼーションをお奨めします。

プロトコール (1)10cm×10cm (100cm^2) のメンブレンに対して最低5mlのPerfectHyb^{TM}を加え、68℃にて20分間以上プレハイブリダイゼーションを行います。

(2)プローブを5分間ボイルします*。

(3)前もって68℃にて加温しておいたPerfectHyb^{TM}（10cm×10cm (100cm^2)のメンブレンに対して最低5ml）にプローブを加え、混和します。

(4)プレハイブリダイゼーション溶液を捨て、(3)で調製したハイブリダイゼーション溶液を加えます。

(5)68℃にて1時間～オーバーナイトでハイブリダイゼーションを行います。

(6)あらかじめ68℃に加温しておいた一次洗浄液にて5分間洗浄を2回行います。

(7)あらかじめ68℃に加温しておいた二次洗浄液にて15分間洗浄を2回行います。

(8)【RI標識プローブの場合】
メンブレンをろ紙の上に取り出して乾燥し、X線フィルムを感光します。

【Non-RI標識プローブの場合】
Non-RI検出プロトコールに従って検出を行います。

*・プローブは、変性後すぐに用いる場合は、特に急冷する必要はありません。
・プローブの変性は、蒸留水などの低塩濃度溶液中で行ってください。
・RNAプローブの場合も変性は必要です。

オリゴヌクレオチドプローブを用いた解析

プローブの調製　プローブの調製は各標識キットの取扱い説明書に従って行い、標識後にフリーのヌクレオチドを除去してください。 RI標識プローブは精製後に比活性を測定し、効率よく標識されていることを確認してください。

プローブのTm値の計算　プローブのTm値の計算は以下のように行ってください。

・18bより短いオリゴヌクレオチドの場合

$$Tm=(A+T)\times 2℃+(G+C)\times 4℃$$

・18b以上の長さのオリゴヌクレオチドの場合

$$Tm=81.5+16.6(\log 10[Na^{+}])+0.41(\%G+C)-(600/N)$$

*A　:オリゴヌクレオチド内のAの数（T、G、Cも同様）
%G+C　:オリゴヌクレオチド内のG+Cの%
N　:オリゴヌクレオチドの塩基数
［Na+］　:0.75M

ハイブリ・洗浄条件　・至適ハイブリダイゼーション条件、洗浄条件を以下に示します。以下のプロトコールでは以下の表に従って行ってください。

Label	Hybridazation	一次洗浄	二次洗浄
時間	1～2時間	5分間×2回	10分間×2回
RI	Tm-10℃	Tm-10℃(A)	Tm-10℃(A)
Non-RI			

(A):洗浄液 A

*プローブのTm値が70℃を越える場合、ハイブリダイゼーション、洗浄共に55～60℃にて行ってください。

・恒温槽を用いる場合には、ハイブリダイゼーションにハイブリバッグを用いると便利です。洗浄はタッパー等を用い、できるだけ振とうしながら行ってください。

・RI標識プローブを用いる場合ハイブリダイゼーションオーブンを用いると、汚染が少なく便利です。ハイブリダイゼーションオーブンを用いる場合は、ハイブリダイゼーションボトル中でハイブリダイゼーションおよび洗浄を行ってください。

プローブ濃度　推奨するプローブ濃度は以下の通りです。プローブ濃度が高いほどハイブリダイゼーションは促進される傾向にありますが、特にNon-RI系においては、バックグラウンドも上昇することも考慮に入れ濃度を決定してください。

Label	Probe conc.
RI	2.5～5pmoles/ml
Non-RI	0.5～1pmoles/ml

プロトコール
(1)10cm×10cm (100cm^2)のメンブレンに対して最低5mlのPerfectHyb^{TM}を加え、至適ハイブリダイゼーション温度にて20分間以上プレハイブリダイゼーションを行います。

(2)前もって至適ハイブリダイゼーション温度に加温しておいたPerfectHyb^{TM}（10cm×10cm (100cm^2)メンブレンに対して最低5ml）にプローブを加え、混和します。

(3)プレハイブリダイゼーション溶液を捨て、(2)で調製したハイブリダイゼーション溶液を加えます。

(4)至適ハイブリダイゼーション温度にて1～2時間ハイブリダイゼーションを行います。

(5)あらかじめ至適洗浄温度に加温しておいた一次洗浄液にて5分間洗浄を2回行います。

(6)あらかじめ至適洗浄温度に加温しておいた二次洗浄液にて10分間洗浄を2回行います。

(7)【RI標識プローブの場合】
メンブレンをろ紙の上に取り出し乾燥して、X線フィルムを感光します。

【Non-RI標識プローブの場合】
Non-RI検出プロトコールに従って検出を行います。

APPENDIX

試薬調製方法

・20×SSC　　3M NaCl
0.3M クエン酸ナトリウム

<1L調製する場合>
1. 175g NaCl、88g クエン酸三ナトリウム二水和物を900mlの滅菌水に溶解する。
2. 1N HClを用いてpH7.0に調整した後、1Lにフィルアップする。
3. 室温で保存する。

・10%SDS　　<500ml調製する場合>
1. 50g SDSを滅菌水で溶解し、500mlにフィルアップする。
2. 室温で保存する。

・洗浄液A　　2×SSC、0.1%SDS

<500ml調製する場合I>
1. 50ml 20×SSC、5ml 10%SDSを445mlの滅菌水に加え、混合する。
2. 室温で保存する。

・洗浄液B　　0.1×SSC、0.1%SDS

<500ml調製する場合>
1. 2.5ml 20×SSC、5ml 10%SDSを492.5mlの滅菌水に加え、混合する。
2. 室温で保存する。

・20×SSPE　　3M NaCl、173mM リン酸二水素ナトリウム、
25mM EDTA

<1L調製する場合>
1. 175g NaCl、27g リン酸二水素ナトリウム二水和物、7.4g EDTA･2Naを800mlの滅菌水に溶解する。
2. 5N NaOHにてpH7.4に調整する。
3. 1Lにフィルアップする。
4. 室温で保存する。

プローブのストリッピング

はじめに　ストリッピング後のメンブレンでは、シグナルが薄くなり、バックグラウンドが上昇する傾向があります。リプロービングを行う場合、ブロッティング後に、ベーキングに加えてUVクロスリンクすることをお奨めします。以下に、代表的なRI標識したDNAプローブのストリッピング法を示します。

・プレブロットされたメンブレンを用いる場合は、そのプロトコールに従ってストリッピングを行ってください。

・メンブレンによってはストリッピング方が指定されている場合がありますので、その場合はそのプロトコールに従ってください。

・ストリッピング法はプローブの種類により異なる場合がありますのでご注意ください。

準備する試薬　・ストリッピング試薬 (100ml)

ホルムアミド	55ml
20×SSPE	10ml
10%SDS	5ml
蒸留水	30ml

・洗浄液B
0.1×SSC(pH7.0)、0.1%SDS

その他準備するもの　・恒温槽（もしくはハイブリダイゼーションオーブン）

プロトコール
(1)メンブレンをハイブリダイゼーションバッグもしくはハイブリダイゼーションボトルに移します。
(2)ストリッピング試薬を10cm×10cm (100cm^2)メンブレンに対して10ml加えます。
(3)68℃にて1～2時間インキュベーションします。
(4)ストリッピング試薬を捨て、洗浄液Bにて68℃、10分間インキュベーションします。
(5)メンブレンをラップに挟みサーベイメーターにてカウントを測定します。（気になる場合は、一晩X線フィルムを感光させシグナルがないことをチェックします。）
(6)カウントがない場合はそのまま実験に使用することができます。直ぐに使用しない場合は、そのまま乾燥させないように保存します。

RI標識DNAプローブの簡易精製

はじめに　ここでは、ランダムプライミング法にてRI標識したDNAプローブの、弊社MagExtractor-PCR&Gel clean up-(Code No.NPK-601)を用いた簡易精製法を紹介します。本キットを用いることにより、安価な精製が可能です(¥25,000/400回)。

準備するもの
- MagExtractor-PCR&Gel clean up-(Code No.NPK-601)
- 75%エタノール
- マグネチックスタンド(市販のもの:弊社 Mag*ical Trapper*(Code No. MGS-101)など)

プロトコール
(1)標識済みDNAプローブ液(～50μl)に200μlの吸着液を加え、軽く混和します
(2)磁性ビーズを15μl加え、ボルテックスミキサーにて時々攪拌しながら2分間放置します(室温)。
(3)マグネチックスタンドでビーズを分離し、上清をピペットで吸い取り廃液タンクに廃棄します。
(4)洗浄液を300μl加え、ボルテックスミキサーにて10秒間攪拌します。
(5)マグネチックスタンドでビーズを分離し、上清をピペットで吸い取り廃液タンクに廃棄します。
(6)75%エタノールを1ml加え、ボルテックスミキサーにて10秒間攪拌します。
(7)マグネチックスタンドでビーズを分離し、上清をピペットで吸い取り廃液タンクに廃棄します。
(8)軽く遠心し、ピペットでエタノールを完全に除去します。
(9)25～50μlの蒸留水を加え、ボルテックスミキサーにてビーズを完全に懸濁させ、室温に2分間放置します。
(10)マグネチックスタンドでビーズを分離し、上清をピペットで新しいチューブに移します。
(11) (9)(10)を繰り返します。

- 操作はアクリル板越しに行ってください。
- スクリューキャップ式1.5mlチューブを用いることにより、汚染を最小限に抑えることができます。
- (11)は省略することができます。

トラブルシューティング

トラブル	原因	対策
シグナルが弱い	露光時間が短い	バックグランドが低い時は、露光時間を延ばしてください。バックグラウンドが高い場合は、バックグラウンドの項を参考にして対策を講じてください。
	プローブの比活性が低い	RI 標識プローブの場合、カウントを測定し確認してください。Non-RI 標識プローブの場合は、スポットテストにより標識効率を確認してください。
	プローブ濃度が低い	バックグラウンドが高くならない程度に、プローブ濃度を高くしてください。
	プローブが古い	RI 標識プローブを用いる場合、ハイブリダイゼーションの直前にプローブを調製してください。 標識後保存することは避けてください。
	プローブの熱変性を忘れている	二本鎖 DNA プローブおよび RNA プローブを用いている場合は、使用直前に熱変性を行うようにしてください。
	ハイブリダイゼーション時間が短い	Northern blot 解析において、発現量低い目的遺伝子の検出を行う場合、オーバーナイトでハイブリダイゼーションを行った方が良好な結果が得られることがあります。
	リプロービングしている	リプロービングを繰り返すほどシグナルが弱まる傾向にあります。露光時間を延ばしてください。
	洗浄条件が不適切	洗浄時間が長すぎる場合は短くします。 また、SSC の濃度（例;0.1×→0.2×)を上げることによってもシグナルは強くなります。しかし、非特異的バンドやバックグラウンドの原因にもなりますので、一度検討してから行ってください。
	ブロットしている核酸の量が少ない	ブロットに使用する核酸量を増やしてください
バックグラウンドが高い	フリーのヌクレオチドが除去されていない	プローブ作製後、フリーの標識ヌクレオチドを除去してからご使用ください。
	プローブの濃度が高い	特に Non-RI 標識プローブを用いる場合は、プローブ濃度を高くすると極端に高いバックグラウンドが生じる場合があります。PerfectHyb^{TM} の推奨する Non-RI 標識プローブ濃度は一般的なプロトコールより低く設定されています。

	プローブの設計に問題がある	4kb 以上の鋳型から調製した長いプローブや、繰り返し配列を有するプローブではバックグラウンドの上昇が見られることがあります。プローブのサイズ、配列を再度チェックしてください。
	操作中メンブレンが乾燥してしまった	ハイブリダイゼーション時、洗浄時などメンブレンが乾燥するとバックグラウンドが上昇します。メンブレンを乾燥させないよう気を付けてください。
	プレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーション時に気泡が入ってしまった	特にハイブリダイゼーションバッグを用いる場合は、ムラの原因になりますので、気泡を念入りに除去することをお奨めします。
	洗浄液の量が少ない	十分量の洗浄液で洗浄を行ってください。
	検出系に問題がある	Non-RI 検出の場合、バックグラウンドが生じ易くなります。取扱い説明書に従い、十分気を付けて検出を行ってください。
エキストラバンドの発生	プローブに非特異的配列が含まれている	プローブに Alu などの繰り返し配列が含まれている場合、予期せぬバンドが生じる場合があります。プローブの設計時に気を付けてください。 また、変性サケ精子 DNA をプレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーション時に、100 μg/ml となるように添加することでエキストラバンドが緩和される場合があります。
	洗浄不足	目的のバンドがはっきりしている場合、洗浄時の回数を増やす、または、洗浄液の SSC 濃度を下げることによりエキストラバンドを除去可能な場合があります。

関連商品

品名及び内容	包装	保存温度	Code No.	価格
MagExtractor-PCR & Gel Clean up-	200 回用*	室温	NPK-601	¥25,000
Mag*ical Trapper*	1 個	室温	MGS-101	¥38,000

* RI 標識プローブの精製スケール(50 μl)では 400 回用としてご使用いただけます。

［製造・販売元］

東洋紡績株式会社

ー納期・注文に関するお問い合わせー

バイオ事業部（大阪）
〒530-8230　大阪市北区堂島浜二丁目２番８号
TEL 06-6348-3786　FAX 06-6348-3833

バイオ事業部（東京）
〒103-8530　東京都中央区日本橋小網町１７番９号
TEL 03-3660-4819　FAX 03-3660-4951

ー製品の内容・技術に関するお問い合わせー

テクニカルライン
TEL 06-6348-3888　FAX 06-6348-3833
開設時間 : 9:00～12:00　13:00～17:00（土、日、祝を除く）
e-mail: techosk@bio.toyobo.co.jp

［URL］http://www.toyobo.co.jp/seihin/xr